海生研研報，第12号，31-40，2009
Rep. Mar. Ecol. Res. Inst., No. 12, 31-40, 2009

特集　魚類ビテロジェニン

ビテロジェニン測定法－最新測定法の解説と開発動向の展望
2．酵素免疫測定法によるビテロジェニンの定量

藤井一則

New Methodology for the Determination of Fish Vitellogenin and Future Problems
2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Quantification of Fish Vitellogenin

Kazunori Fujii*

1．はじめに

酵素免疫測定法は，一般にエライザあるいはエライサ（ELISA：Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）と略称される高感度の定量法であり，酵素で標識した抗体（測定対象物質と特異的に結合する免疫グロブリン，主にIgG）を用いる方法と，酵素で標識した抗原（測定対象物質）を用いる方法に大別される。

酵素標識抗体を用いるELISAは，固相化した非標識抗体との間に抗原を挟むことからサンドイッチELISAあるいはサンドイッチ法とも呼ばれ，蛋白質などの高分子化合物の定量に適している。後者の酵素標識抗原を用いる方法は，固相化した抗体との結合を巡って試料中の抗原と競い合わせることから競合法と言われ，サンドイッチ法に比べて特異性（測定対象物質のみを選択的に検出すること）や定量性の面でやや劣る。しかしながら，測定したい物質がステロイドホルモンなど概ね分子量（MW）1,000（1 kDa）以下の低分子化合物の場合は，抗体が結合する抗原の特定部分（エピトープ）が少なく，2種類の抗体でサンドイッチすることが難しいため，競合法が採用されている（上田，2007）。なお，抗原を固相化して酵素標識抗体を結合する方法もあるが，抗原の有無を調べる定性法としては使えるものの，夾雑物の影響を大きく受けるために血清などを試料とする場合は定量性に欠ける。ここでは，魚類のビテロジェニン（Vg）測定法として一般的なサンドイッチ法について解説する。

2．ビテロジェニンの精製

Vgの精製法として，種々のカラムを用いた方法が報告されているが，前章で飯島が解説しているPOROS HQカラム（アプライドバイオシステムズジャパン）を用いたHPLC法が最も簡便であり，魚種によっては1ステップでほぼ完全に精製できる（Yamanaka *et al.*, 1998）。しかしながら，マダイ*Pagrus major*では複数のVgが近接したリテンションタイムで溶出されることが示唆されており（Yamanaka *et al.*, 1998），個々の蛋白質に分けて測定する必要がある場合には更なる工夫を要する。

Ohkubo *et al.*（2003）は，マハゼ*Acanthogobius flavimanus*の530kDa（Vg-530）と320kDa（Vg-320）の2種類のVgを以下の方法で精製している。エストラジオール-17ß（E_2）を1 mg/mLとなるようプロピレングリコールに溶かし，魚体重1 kg当たり1 mL（1 mg･E_2/kg体重）を筋肉に注射する。

（2008年10月7日受付，2008年10月23日受理）
＊　独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所（〒739-0452　広島県廿日市市丸石2-17-5）
E-mail: kazfujii@affrc.go.jp

６日後に採血[注1]し，滅菌済み遠沈管に移して４℃で一晩放置し，血液を凝固させる。Vgの酵素分解を防止するため，採血に用いる注射器には予め10mM（1.74mg/mL）フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）及び10%アプロチニン溶液（≧350KIU[注2]/mL，シグマ）を含む生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム）を血液の10%量添加しておく。凝固した血液を４℃，5,000×gで10分間遠心分離し，上清の血清（E_2処理魚血清）を回収して使用時まで−80℃で保存する。

10mM PMSFを含む100mMリン酸カリウム緩衝液[注3]（PP）pH7.3で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム（15×40mm，バイオ・ラッド ラボラトリーズ）にE_2処理魚血清0.5mLを添加し，流速１mL/minで同緩衝液を通液して非吸着蛋白質を洗い流す。原著には記述されていないが，一般的には溶出液を紫外線検出器に通し，280nmの光吸収が殆ど無くなるまで緩衝液を流す。次いで500mMのPPを流し，吸着した血清蛋白質を溶出する。溶出液を１mL毎に分画し，ウシ血清アルブミン（BSA）を標準蛋白質としてLowry法により各画分の蛋白質濃度を測定する（Lowry *et al.*, 1951）。蛋白質のピーク画分を，150mM塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液[注4]pH8.0（TBS）で平衡化したゲルろ過カラムSuperose 6 HR 10/30（GEヘルスケア バイオサイエンス）に添加し，流速0.5mL/minでTBSを流して530kDaのピーク画分を分取することにより，精製Vg-530が得られる。なお，各画分の分子量は，別途ゲルろ過用分子量マーカー（Gel Filtration Calibration Kit HMW，GEヘルスケア バイオサイエンス）を分画することによって決定する。

Vg-320は，成熟した雌の卵巣卵から精製されている。切り出した卵巣に20倍量の冷生理食塩水を添加し，ホモジナイズ後に４℃，15,000×gで10分間遠心分離する。遠心後の上清を，100mM PPで平衡化したハイドロキシアパタイトカラムに添加し，素通りした蛋白質のピーク画分をSuperose 6によって分画する。320kDaのピーク画分を，TBSで平衡化した陰イオン交換カラムMono-Q HR 5/5（5×50mm，GEヘルスケア バイオサイエンス）に添加し，TBSを流して素通りした蛋白質を分取する。同蛋白質画分を，再度Superose 6で分画して，精製Vg-320が得られている。なお，精製過程で必要とする画分の容量が増加した場合は，適宜吸水剤（みずぶとりくん，アトー）を用いて濃縮する。

Amano *et al.*（2007）は，ボラ*Mugil cephalus*の卵巣抽出液を試料とし，水沈殿，硫安塩析さらにはハイドロキシアパタイトカラム，陰イオン交換カラム（POROS HQ），最後にゲルろ過カラムを用いた液体クロマトグラフィーの組み合わせにより，３種類の卵黄蛋白質を精製して抗原とし，各々に対応する３種類のVgに対する抗体を得ている。

３．抗ビテロジェニン血清の作製

近年では，抗血清や抗体を受注生産する会社が数多く存在すること，並びに動物愛護の観点から動物実験が実施しにくくなっていることなどから，自分で作製する機会は少なくなる傾向にあるが，参考までに筆者がウサギを用いてマコガレイ*Pleuronectes yokohamae*のVgに対する抗血清を作製した例を紹介する。

まず，抗体を作りやすくするために，Vgとアジュバント（免疫増強剤）とを混合し，注射箇所での貯留性を高めるために以下の方法で乳化させる。E_2処理マコガレイ血清から，POROS HQとゲルろ過によって精製したVg（１mg/mL）0.2mLをルアーロックシリンジ（ハミルトン）に量り取り，0.2mLのアジュバント（TiterMax Gold，フナコシ）を量り取ったシリンジと三方コックで直角につなぐ。始めにVg溶液をアジュバント側に押し出し，次に混合液を空になったシリンジに押し戻す。その操作を３～５分間繰り返す。両方の液が良く混ざったら三方コックを少し絞り，さらに同様の操作を繰り返す。押し出す際の抵抗が強まり，十分乳化（しばらく放置しても水層と油層が分離しないことを確認）したら，一方のシリンジに全液を移し，三方コックから外して太さ21Gの注射針を付ける。なお，TiterMax Goldの取扱説明書には容量に応じた種々の乳化法が記載されており，インターネット上にも公開されている（フナコシ）。

抗体産生に用いるウサギとして，抗体を作りやすいためにニュージーランドホワイトが良く用いられるが，筆者は耳の大きさと扱いやすさから日本白色種の雌を使用している。ウサギ，ウサギ飼育用の器材，飼料など必要なものは全て市販されている（オリエンタル酵母工業など）。ウサギを固定箱（シナノ製作所，夏目製作所など）に入れ，蓋の代わりに煉瓦やブロックなどで体の前部を覆

うと，以下の作業が一人でできる。

利き手でハサミあるいはバリカン，逆の手で掃除機の吸い込み口を持ち，掃除機で刈った毛を吸い込みながら背中の肌を10cm四方ほど露出させる。70%エタノールを含ませた脱脂綿で露出した肌を消毒し，前述の乳化液を５～６カ所に分けて皮下注射[注5]する。２週間後に，精製Vg溶液のみ0.2mLを，初回の注射痕を避けて３～４カ所に分けて注射する。初回免疫にアジュバントとしてフロイント完全アジュバント（和光純薬工業など）を用いる場合には，２週間おきに３～４回の追加免疫を行う方が良い。また，その追加免疫時には，結核菌の死菌を含まないフロイント不完全アジュバントを用いる場合が多い。

最終免疫の２週間後に，ウサギを固定箱に入れ，耳だけが外に出るようにして蓋をする。70%エタノールを含ませた脱脂綿で耳の縁辺部を消毒し，23Gの注射針を用いて外側を通る太い血管から１mLほど試験採血をする。採血後は，すぐに注射跡を滅菌した脱脂綿などで１～２分間押さえ，止血を確認する。採取した血液は，1.5mLの遠心管（エッペンドルフなど）に移し，室温で１時間放置後，４℃で一晩保存し，十分に凝血してから血清（抗血清）を遠心分離する。抗血清の抗体価を後述の方法で確認し，満足する結果が得られたら本採血を行い，抗体価が十分でない場合は，追加免疫，試験採血及び抗体価の確認を繰り返す。

本採血は，心臓から全採血する方法もあるが，耳からでも十分量の血液が得られる。前述のように固定したウサギの耳縁辺部血管をカミソリでカットし，流出する血液をスタンドに立てた50mL遠心管に受ける。その際，耳の先端を軽く手で保持し，血液が遠沈管の外に溢れないようにする。また，カットする部位が頭に近すぎると，固定箱が血液を受ける妨げとなるので注意する。血液の流出速度が低下したら，キシレンを含ませた脱脂綿で血管の上流を軽く拭くと流出する勢いが回復する。この方法で，ウサギ体重の１%程度の血液が得られるが，より多くの血液が必要な場合には，２～４週間間隔で繰り返し採血可能であり，必要に応じて追加免疫を施す。採取した血液から，試験採血と同様の手順で抗血清を遠心分離し，小分けして－20℃以下で冷凍保存する。４℃で冷蔵保存する場合は，防腐剤としてアジ化ナトリウム（NaN_3）を0.05%量（w/v）添加すれば少なくとも２～３年は使用できる。

４．抗血清の抗体価の確認

抗血清の抗体価は，抗原を固相化したELISAなど種々の免疫学的定量法によって確認できるが，ここでは簡便なドットブロッティング法の１例を紹介する（Fig. 1）。精製したVgをTBSで希釈し，1，3，10，30，100μg/mLの標準液を調整する。縦１cm，横５cmの大きさに切り取り，右上を少しカットして上下左右が分かるようにしたニトロセルロース膜（サポート付ニトロセルロースメンブレン，バイオ・ラッド ラボラトリーズ）上に，１cm間隔で１～100μg/mLの標準液各１μLを滴下して風乾する。直径９cmのシャーレに量り取ったスキムミルク１gを20mLのTBSで溶かし，乾いた膜を浸して蓋をする。シェーカー（インビトロシェーカー，タイテックなど）上で１時間穏やかに振とう後，20μLの界面活性剤Tween-20を添加して良く撹拌し，さらに抗血清10μLを直接膜に滴下しないよう注意しながら添加して振とうする。１時間後に液を捨て，0.1%のTween-20を含むTBS（TBS-T）を20mL添加して５分間振とう洗浄する。新しいTBS-Tに交換し，同じ洗浄操作を更に２回繰り返す。洗浄液を捨てた後，10mLのTBS-T及びホースラディッシュパーオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ウサギIgG（バイオ・ラッド

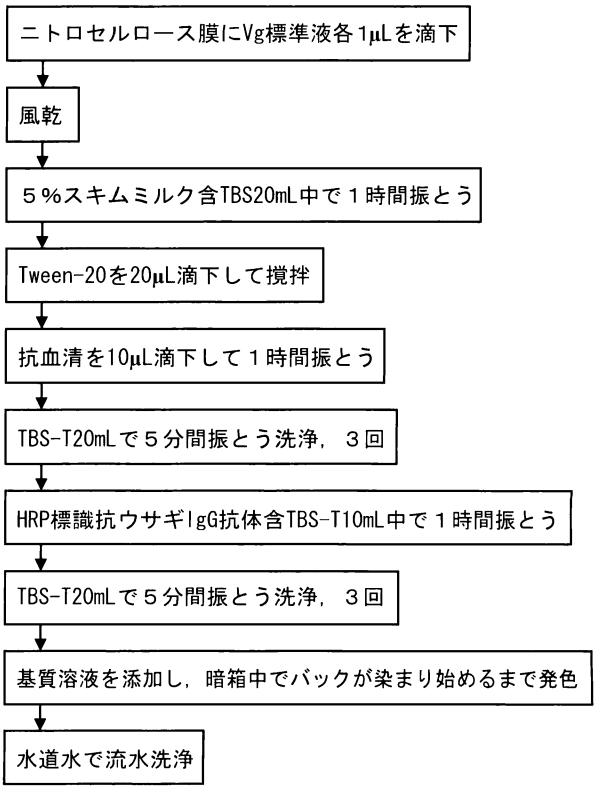

Fig. 1 Dot-blotting procedure for screening antibody titer of antiserum.

ラボラトリーズ）3.3μLを添加する。１時間振とう後，上記同様TBS-Tで３回振とう洗浄し，10mLの基質溶液[注6)]を添加する。基質としてオルトフェニレンジアミン（OPD，和光純薬工業など）を用いる場合は，暗箱に入れて時々発色状況を観察し，バックグランドが発色し始めたら水道水で流水洗浄して発色を止める。筆者は，本法で10μg/mL以下のVgの発色が肉眼で確認出来れば，十分に抗体価が上がったと判断している（Fig. 2）。

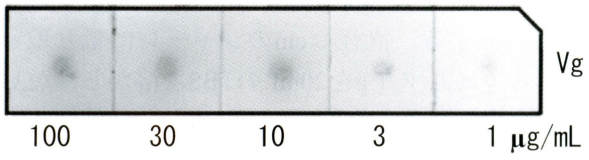

Fig. 2 Dot-blotting of the purified vitellogenin (Vg) for screening antibody titer of anti-vitellogenin antiserum.

なお，得られた抗血清が，卵黄蛋白質前駆物質（卵抽出液と反応する），雌特異蛋白質（正常雄血清や未熟雌血清とは反応しないが成熟雌血清と反応する）及びエストロゲン誘導蛋白質（E_2処理魚血清と反応する）というVgの定義を満たす蛋白質を特異的に認識することを確認しておく必要がある。抗血清の特異性は，ドットブロッティング法でも大まかには調べられるが，認識する蛋白質を確認するために，卵抽出液，正常雄血清，成熟雌血清，E_2処理魚血清，精製Vgなどを試料としたウェスタンブロッティング法の実施を推奨する。同法は，市販のゲル（パジェルSPG-520L，アトーなど），泳動装置（ラピダス・ミニスラブ電気泳動装置，アトーなど），ブロッティング装置（ホライズブロット，アトーなど）を必要とし，それらの機器には丁寧な取扱説明書が添付されているので，ここでの説明は省略する。また，ブロッティング膜のバンドの検出は，上述のドットブロットでの検出法に準じ，膜のサイズに合わせてスケールアップすれば良い。

５．標識抗体の作製

得られた抗血清から，市販のプロテインAあるいはプロテインGカラム（HiTrap Protein A FFあるいはHiTrap Protein G HP，GEヘルスケア バイオサイエンスなど）を用い，カラムの取扱説明書に準じてIgGを精製する。精製するIgG量は，96穴プレート１枚当たり0.2mgを目安にし，サンプル数に応じて算出する。筆者は，標識抗体として酵素標識IgGではなく，ビオチン標識$F(ab')_2$を用いている。IgGから，抗原との結合に関与しないFc領域を除いた$F(ab')_2$を用いることにより，非特異結合を軽減させることができる。また，ビオチン標識を施すことにより，必要に応じて市販のアビジンに結合した様々な酵素あるいは蛍光物質などの利用が可能となり，応用範囲が格段に広がる。さらに，酵素よりも分子量が小さいビオチンを標識することにより，抗原抗体反応における立体障害を軽減する効果も期待できる。ビオチン標識$F(ab')_2$は，以下の方法で作製する（Fig. 3）。

まず，精製したIgGの一部を脱塩用カラム（エコノパック10DGカラム，バイオ・ラッド ラボラトリーズなど）を用いて，100mM塩化ナトリウムを含む100mM酢酸ナトリウム緩衝液[注8)]pH4.5に溶媒交換し，分画分子量10kDaの限外ろ過（ミリポアなど）によって濃縮して10mg/mL前後に調整する。ここで用いるIgG量は，96穴プレート１枚当たり0.1mgを目安に計算する。ブタ胃由来ペプシン（和光純薬工業など）を0.4mg/mLとなるよう添加し，穏やかに撹拌，溶解して37℃で15～20時間消化する。ペプシン消化後，$F(ab')_2$（100kDa）とFc（50kDa）及びペプシン（35kDa）を分離するため，10～100kDaを分画範囲としてカバーするゲルろ過カラム（Superose 12 HR 10/30，GEヘルスケア バイオサイエンスなど）で分

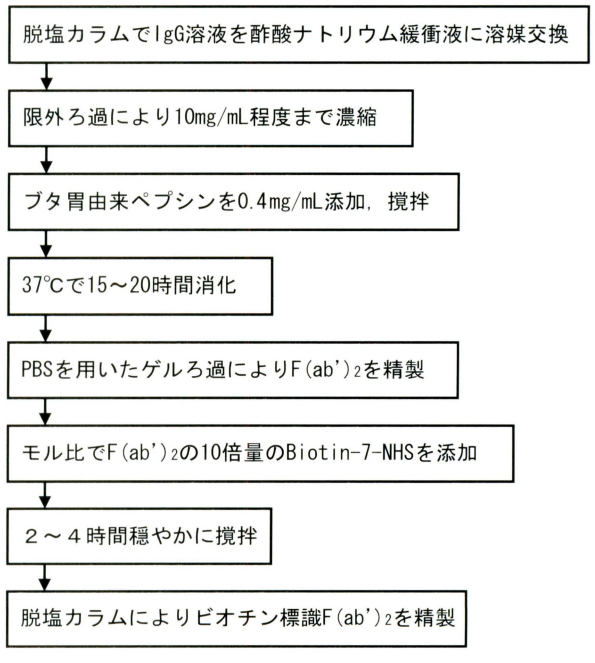

Fig. 3 Procedures for fragmentation of IgG to $F(ab')_2$ and labeling of $F(ab')_2$ with biotin.

画する。ここでのゲルろ過には，ビオチン化のための溶媒交換を兼ねて，リン酸緩衝生理食塩水[注9]（PBS）を用いる。ビオチン標識には，アビジンと結合する際の立体障害を考慮して，適当なスペーサーを有した標識試薬（Biotin-7-NHS，ロシュ・ダイアグノスティックスなど）を用いる。Biotin-7-NHS（MW=454）の場合，必要量をジメチルスルホキシド（DMSO）で溶解し，モル濃度として標識したい蛋白質の10倍，かつ蛋白質溶液の1/10～1/50容量となるように添加する。$F(ab')_2$は100kDaであるから，蛋白質濃度が10mg/mL（0.1mM）の場合には，Biotin-7-NHSを9.1mg/mL（20mM）に調整して，$F(ab')_2$溶液1mLあたり50μLを添加する。室温下，チューブローテーター（TR-350，アズワンなど）を用いて２～４時間穏やかに撹拌することにより，ビオチン標識$F(ab')_2$が得られる。余分なビオチンは，アビジンと反応する際に競合するので，PBSで平衡化した脱塩カラムなどを用いて除去し，蛋白質濃度を測定する。こうして得られたビオチン標識$F(ab')_2$は，0.05%量のNaN_3を添加しておけば４℃で少なくとも２～３年は保存できる。小分けして－20℃以下で冷凍すれば，さらに長期間保存できるが，一旦解凍したものは冷蔵保存し，凍結，融解は繰り返さない。

６．酵素免疫測定法

ELISAの実験方法を，順を追って解説する（Fig. 4）。

①抗体の固相化：ELISAに用いるプレートは，平底で，蛋白質吸着能が高く，出来れば検定付のものを用いる。固相化用のIgG希釈液は，50mM炭酸緩衝液[注10] pH9.6が推奨される。また，固相化用IgG液の濃度は，報告によって異なるが，高結合能プレート（マキシソープ，ナルジェ ヌンク インターナショナルなど）でも結合できる蛋白質は数百ng/㎠であり，濃度を高くし過ぎてもIgGの無駄になるだけである。筆者は，自作したウサギ抗マコガレイVg抗体の場合，濃度10μg/mL，添加量を100μL/穴としている。連続分注器（フィンピペット，エッペンドルフピペットなど）を用いると効率的に分注出来る。泡を立てないように注意して固相化用IgG液を添加した後，プレートシール（アズワンなど）を貼って蒸発を防ぎ，４℃で一晩放置する。なお，プレートは必ず側面を持ち，以後も決して底面に触れないよう注意する。

②洗浄：プレートシールを剥がし，プレートの側面を持って流し台で逆さにして数回振り下ろして十分に排液する。その際，跳ね返った液がプレートに付着しないように注意する。排液後，0.1% Tween 20を含むPBS（PBS-T）を250μL/穴分注し，数秒間穏やかに撹拌してから排液する。同様のPBS-Tの分注，排液を３回以上繰り返す。本ステップ②での試料穴間のコンタミネーションは問題とはならないが，分注の際にピペットチップが試料穴の側面や底面に触れると，固相化IgGを削ぎ落とす恐れがあるので注意する。洗浄操作（特に後の⑥⑧⑩）は，試験結果を大きく左右し，洗浄回数も多いので，専用のプレートウォッシャー（バイオ・ラッド ラボラトリーズなど）の使用を推奨する。ただし，８あるいは12チャンネルの手動ウォッシャーを使用する場合は，試料穴間のコンタミネーションに注意を払う必要がある。洗浄後，プレートを下向きのまま清浄なキムタオル（日本製紙クレシア）に押しつけ，次いでキムタオルに液が付かなくなるまで数回強く垂直に叩きつける。この際，プレートの破損を防ぐため，キムタオルを数cmの厚さに重ねるか，適当なクッションを下に敷く。また，後述の⑥⑧⑩では特に，試料穴間のコンタミネーションを避けるため，常にキムタオルの新しい（濡れていない）面に叩き付ける

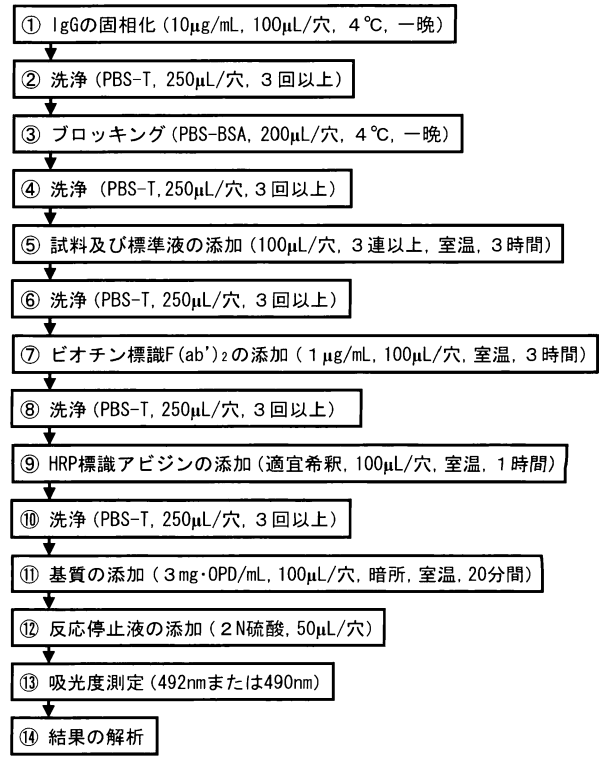

Fig. 4 ELISA procedure for marbled sole vitellogenin.

ようにする。

③ブロッキング：１％BSAを含むPBS（PBS-BSA）を各試料穴に200μL分注し，プレートシールを貼って４℃で一晩放置する。この操作により，IgGの吸着していない面をBSAで覆うことになり，バックグランドを低減できる。また，PBS-BSAを添加した状態で，少なくとも１ヶ月は冷蔵保存できる。防腐剤として0.01％のチメロサールあるいは0.05％NaN_3を添加しておけば，数ヶ月程度は保存できる。ただし，NaN_3にはHRPの活性を阻害する作用があるので，NaN_3を含むPBS-BSAは，後述⑨のHRP標識アビジン希釈用のPBS-BSA-Tには使用できない。

④洗浄：②と同じ。

⑤試料及び標準液の添加：試料血清[注11]及び精製Vgを，0.1％Tween 20を含むPBS-BSA（PBS-BSA-T）で種々の濃度に希釈し，ブロッキングを終えたプレートに各々100μL/穴を添加する。試料や精製Vgを含まないPBS-BSA-Tをブランクとする。データの精度向上のためには，最低２連（全て２穴ずつに添加する），出来れば３連以上で試験することを推奨する。緩やかに撹拌後，プレートシールを貼って室温で３時間放置し，固相化IgGにVgを補足させる。プレートと同じ12列８行の表シート（エクセル，マイクロソフトなど）を作成し，各試料穴に添加した試料や希釈率などを記入しておく。

⑥洗浄：②と同じ。

⑦ビオチン標識抗体の添加：ビオチン標識$F(ab')_2$をPBS-BSA-Tで１μg/mLとなるように希釈し，各試料穴に100μLずつ分注する。緩やかに撹拌後，プレートシールを貼って室温で３時間放置することにより，固相化IgGに補足されたVgとビオチン標識$F(ab')_2$を結合させる。

⑧洗浄：②と同じ。

⑨酵素標識アビジンの添加：市販のHRP標識アビジン（ExtrAvidin®－Peroxidase，シグマなど）を，添付された説明書に記載されているELISA用の倍率となるようPBS-BSA-Tで希釈し，各試料穴に100μLずつ分注する。ちなみに，ExtrAvidin®－Peroxidaseは，1,000倍希釈が最適とされている。アビジンとビオチンの結合反応は１時間以内で平衡に達するので（Okumura *et al.*, 1995），ここでの反応条件は室温，１時間で良い。この操作によって，一定の濃度範囲内で試料中のVg濃度に比例してHRPがプレート上に補足される。

⑩洗浄：②と同じ。

⑪基質の添加：基質溶液[注6]を各試料穴に100μLずつ分注し，暗箱などに入れ遮光して室温で20分間放置する。

⑫反応停止液の添加：各試料穴に２Nの硫酸を50μLずつ添加し，発色反応を止める。

⑬発色強度の測定：プレートリーダーを用いて波長492nm（または490nm）の吸光度を測定し，発色強度を数値化する。吸光度専用プレートリーダーの低価格化が進んでいるが，予算に余裕が有る場合は発光，蛍光，時間分解蛍光なども測定可能な機種を選択しておくと，応用範囲が広がる。

⑭結果の解析：エクセルなどの表計算ソフトに得られたデータを入力し，標準液のVg濃度と吸光度の回帰式を求める。エクセルの場合，右列（または下行）にVg濃度，左列（または上行）に各濃度の吸光度平均値を並べて入力し，グラフウィザードで散布図を選択してグラフ上にプロットする。「近似値の追加」コマンドで「線形近似」を選択し，同コマンドのオプションにある「グラフに数式を表示する」及び「グラフにR-2乗値を表示する」をクリックする。筆者は，決定係数（R^2）が0.99を超える範囲を目安として定量範囲とし，試料の吸光度データを表示された数式に当てはめて個々のVg濃度を求めている。また，定量下限値は，ブランクの吸光度の平均値＋標準偏差×３，かつブランクよりも有意に高い値を示した標準液の最も低いVg濃度としている。さらに，変動係数（標準偏差÷平均値×100）が５％を超えるなど，同じ試料を入れた３連以上のデータで異常値が出た場合には，近似した２連以上の平均を取るか再試験を行う。また，定量範囲を外れた試料は希釈率を変えて再試験を行い，やむを得ず２連で試験した場合で両方の値がばらついた試料も，出来れば３連以上で再試験することを推奨する。

７．酵素活性の測定例

0.20～200ng/mLのHRP（比活性400units/mg，和光純薬工業）水溶液を，各濃度４連で10μLずつプレートに添加し（2.0～2,000pg），前記⑪の方法で発色させてプレートリーダーWallac1420 ARVOsx（パーキンエルマージャパン）で490nmの吸光度を測定した。その結果，2.0～1,000pgの範囲でR^2=0.996の回帰式が得られた（Fig. 5A）。同回帰式に，各添加量の吸光度を当てはめた計算

値と設定添加量との誤差は，7.8pg以下で濃度が低下するに従い著しく増大した（Fig. 6）。そこで，2.0～16pgの範囲で求めた回帰式（Fig. 5B，R^2=0.990）に各添加量の吸光度を当てはめると，同範囲の誤差が17%以下にまで低下した（Fig. 6）。また，最低量である2.0pgの吸光度（0.086±0.0004）は，ブランクの吸光度（0.082±0.0006）の平均値プラス標準偏差の３倍，かつブランクよりも有意に高い値を示した。さらに，全ての試験区で，変動係数は５％未満であった。これらの結果から，今回用いた比活性400units/mgのHRPでは，誤差を20%まで許容すれば，16pgを境界として２種類の回帰式を用いることにより，2.0～1,000pgの広い範囲で酵素活性が測れることが明らかになった。

８．マコガレイビテロジェニンの酵素免疫測定法

筆者が，マコガレイVgのサンドイッチ法を検討した事例を紹介する。0.020～80ng/mLの精製Vgを用い,各濃度４連で前述の①～⑬に従い吸光度を測定した。その結果，0.020ng/mLとブランクとの吸光度に有意差は認められず，0.039ng/mLの吸光度（0.174±0.003）は，ブランクの吸光度（0.154±0.005）の平均値プラス標準偏差の３倍，かつブランクよりも有意に高い値を示した。また，0.039～5.0ng/mLの範囲でR^2=0.996の回帰式が得られた（Fig. 7A）。同回帰式に各濃度の吸光度を当てはめて得た計算値と，設定濃度との誤差は，0.078ng/mL以下で著しく大きくなった（Fig. 8）。

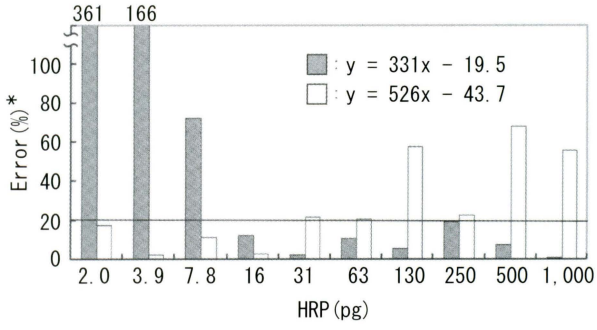

Fig. 6 Relative errors of quantity of horseradish peroxidase (HRP) calculated by regression equations in Fig. 5A (black column) and 5B (white column). * : Error=(|nominal value - calculated value|) ÷ nominal value × 100.

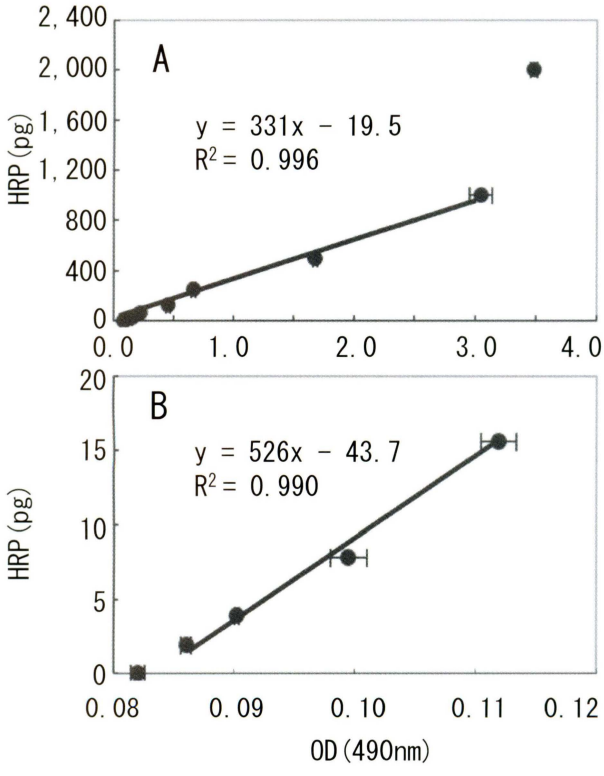

Fig. 5 Relationship between quantity of horseradish peroxidase (HRP) and color intensity (optical density, OD) of *o*-phenylenediamine in the range of 2.0-1,000pg (A) and 2.0-16pg (B).
Each point represents the mean of quadruplicate determinations ± standard deviation of the mean.

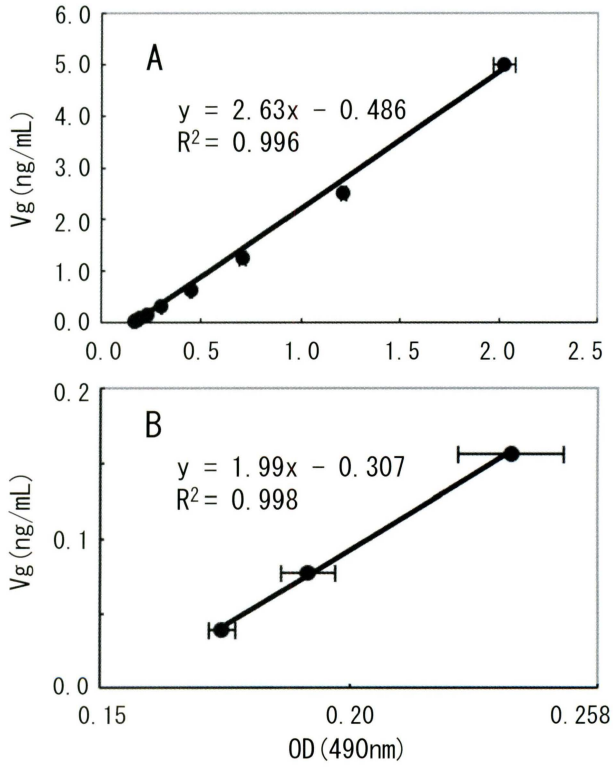

Fig. 7 Standard curves in the range of 0.039-5.0ng/mL (A) and 0.039-0.16ng/mL (B) in ELISA of marbled sole vitellogenin (Vg).
Each point represents the mean of quadruplicate determinations ± standard deviation of the mean.

そこで，0.039～0.16ng/mLの範囲で求めた回帰式（Fig. 7B，R^2=0.998）に各濃度の吸光度を当てはめた結果，同濃度範囲の誤差が５％未満に減少した（Fig. 8）。各濃度区の変動係数は，0.020ng/mLを除き，全て５％未満であった。これらの結果から，0.16ng/mLを境界として２種類の回帰式を用いることにより，0.039～5.0ng/mLの範囲でVgが定量できることが明らかになった。

９．おわりに

ELISAにおける各反応は，反応時間，温度，抗原や抗体の質や量などによって影響を受ける。従って，新しいELISAの系を確立するためには，「６．酵素免疫測定法」で示したこれらの条件を参考として，独自に最適条件を見つけ出す必要がある。なお，抗原抗体反応時の温度については，抗体産生に用いたウサギの体温に近い39℃前後が至適温度と考えられ，インキュベーターなどで温めると時間短縮が期待できる。しかしながら，加温するとプレートに温度差を生じて縁辺部の試料穴ほど値が高くなる，いわゆるエッジ効果が現れる場合がある。従って，急激な温度変化のない室温で反応させる方が，より安定した結果を得ることができる。なお，気温が低い場合は，空調により室温を20℃以上に保つことが望ましい。また，冷蔵保存した溶液をすぐに使うと，ピペッティング誤差の原因となるため，必要量だけ取り出して１時間ほど放置し，室温に戻してから使用する必要がある。ピペッティングは，一定の順番とリズムで行うことを心がけ，試料穴間の反応時間を出来るだけ均等にする。さらには，常に標準液（Vg濃度既知の血清の希釈系列でも可）を試料とともに測定し，その都度求めた回帰式によって試料のVg濃度を計算する必要がある。

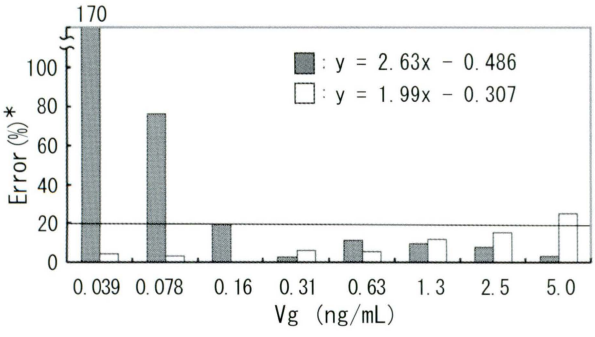

Fig. 8 Relative errors of vitellogenin concentrations calculated by regression equations in Fig. 7A (black column) and 7B (white column).
* : Error = (|nominal value - calculated value|) ÷ nominal value × 100.

本稿で例示した，酵素（HRP）と発色基質（OPD）の組み合わせでは，他の実験条件にもよるがng/mLオーダー以下の定量下限値が期待できる。さらなる高感度化の工夫が種々報告されているが（河野・石川，1992），酵素（ImmunoPure® Avidin Alkaline Phosphatase Conjugated，タカラバイオなど）を変えた発色法，あるいは同じHRPでも発光基質（SuperSignal® ELISA Femto Chemiluminescent Substrate，タカラバイオなど）に変更することなどによっても，高感度化が期待できる。また，酵素の代わりにランタノイドを標識した市販のアビジン（DELFIA Eu-labeled streptavidin，パーキンエルマージャパン）を用いることにより，バックグランドの低い蛍光検出法である時間分解蛍光免疫測定法への変更も可能である（藤井ら，2002，2006）。しかし，発光法や蛍光法は，発色法よりも高価な試薬や検出機器を必要とするので，それらも総合的に勘案して目的に合った方法を選択することが重要である。

10．解説

注１）採血：供試魚を，飼育水で希釈した麻酔液（オイゲノールの場合は5,000～20,000倍希釈）に浸漬して十分に麻酔を施した後，濡れたタオルなどを巻いて魚体を固定する。尾柄部を露出させ，体高の最も狭まった部分付近の腹側から注射針を挿入し，斜め前方に穿刺する。鱗が邪魔な場合は，ピンセットなどで取り除くか，鱗の隙間から穿刺する。針先が脊椎骨に当たる感触が確認できたら，ピストンをゆっくり引いて採血する。注射器（テルモやニプロなど）のサイズは，必要とする血液量や魚の大きさによって異なるが，最大採血量が魚体重の約２％（魚種によって多少異なる）であることを目安に選択するとよい。注射針も，魚の大きさなどによって23G～18G（内径0.3～0.8mm）の範囲で選択されることが多い。供試魚が極めて小さくて注射器採血が困難な場合は，尾柄部を切断し，出血箇所にヘマトクリット管を当てることにより毛細管現象によって採血できる。また，高濃度のE_2曝露によって腹水が貯まる場合には，注射器で採水するか，開腹してPMSFやアプロチニンを含む氷冷したTBSに浸漬して回収し，Vg精製用の材料とすることができる。

注２）KIU：Kallikrein Inhibitor Unit（カリクレイン阻害活性）の略。１KIUは，pH８，室温，２時

間で蛋白質分解酵素の一種であるカリクレイン２単位の効力を半減させる力価。文献により多少異なるが，1,300KIUが１TIU（トリプシン阻害活性）となる。

注３）リン酸カリウム緩衝液：リン酸水素二カリウム（MW=174）及びリン酸二水素カリウム（MW=136）を別々のビーカーに量り取り，蒸留水に完全に溶かして規定の濃度（100mMの場合には各々17.4g/L及び13.6g/L）となるよう定容する。pH7.3の場合には，リン酸水素二カリウム液がリン酸二水素カリウム液の３倍以上必要となるので，pHメーターで確認しながら，かつマグネチックスターラーで撹拌しながら，リン酸水素二カリウム液にリン酸二水素カリウム液を徐々に加える。

注４）トリス塩酸緩衝液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（MW=121）をビーカーに量り取り（20mMの場合は2.4g），蒸留水を加えて約900mLとし，完全に溶解する。pHメーターで確認しながら，かつマグネチックスターラーで撹拌しながら目的のpHとなるまで塩酸を徐々に加えた後，蒸留水で１Lに定容する。塩化ナトリウム（MW=58）を添加する場合には，必要量（150mMの場合は8.7g）を添加して完全に溶かしてからpHを調整する。

注５）皮下注射：皮と筋肉の間に，注射針を１㎝ほど水平に滑り込ませるように挿入し，１カ所に0.1mLを超えない量を打つ。注射針の挿入が浅過ぎたり，１カ所に多く打ち過ぎると，針を抜いた後に乳化液が体外に出てしまうので注意する。

注６）基質溶液：ブロッティングもELISAと同様に，用いる酵素，基質及び検出法によって感度が大きく異なる。ここでは，後述の ELISAと同じ酵素（HRP）と発色基質（OPD）を用いることとした。30mgのOPDを10mLの100mMクエン酸緩衝液[注7)]pH5.0で溶解し，過酸化水素水２μLを加えてHRPの基質溶液とする。OPDの結晶を用いる場合は，超音波洗浄器に浸漬すると早く溶ける。HRPの触媒によって過酸化水素が還元され，さらにOPDが酸化されて発色し，一定の濃度範囲では，HRP量と発色強度が比例する。基質溶液は，使用直前に調整する。

注７）クエン酸緩衝液：クエン酸（MW=192）及びクエン酸ナトリウム（MW=294）を別々のビーカーに量り取り，蒸留水に完全に溶かして規定の濃度（100mMの場合には各々19.2g/Lと29.4g/L）となるよう定容する。pH5.0の場合には，クエン酸液とクエン酸ナトリウム液の混合比がほぼ２：３となるので，pHメーターで確認しながら，かつマグネチックスターラーで撹拌しながら，クエン酸ナトリウム液にクエン酸液を徐々に加える。

注８）酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸ナトリウム（MW=82）をビーカーに量り取り（100mMの場合は8.2g），蒸留水を加えて約900mLとし，完全に溶解する。pHメーターで確認しながら，かつマグネチックスターラーで撹拌しながら目的のpHとなるまで氷酢酸を徐々に加えた後，蒸留水で１Lに定容する。塩化ナトリウムを添加する場合には，必要量（100mMの場合は5.8g）を添加して完全に溶かしてからpHを調整する。

注９）リン酸緩衝生理食塩水：塩化ナトリウム8.0g，塩化カリウム0.20g，リン酸水素二ナトリウム1.15g，リン酸二水素カリウム0.20gをビーカーに量り取り，蒸留水で完全に溶かして１Lにメスアップする。

注10）炭酸緩衝液：炭酸ナトリウム（MW=106）及び重炭酸ナトリウム（MW=84）を別々のビーカーに量り取り，蒸留水に完全に溶かして規定の濃度（50mMの場合には各々5.3g/Lと4.2g/L）となるよう定容する。pH9.6の場合には，重炭酸ナトリウム液が炭酸ナトリウム液の２倍以上必要となるので，pHメーターで確認しながら，かつマグネチックスターラーで撹拌しながら，重炭酸ナトリウム液に炭酸ナトリウム液を徐々に加える。

注11）試料血清：試料血清は，Vg以外の成分の影響をできるだけ排除するため，少なくとも10倍以上希釈した方が良い。また，魚が小さくて採血が困難な場合は，肝臓あるいは魚体全部の抽出液を試料とする。肝臓あるいは魚体の重量を測定した後，氷冷した10倍量（v/w）の50mM （14.6mg/mL）EDTA，10mM PMSF及び900KIU/mLアプロチニンを含むPBS（TBSでも可）に浸漬し，氷上でホモジナイズ後に４℃，15,000×gで10分間遠心分離する。遠心後の上清（上層に膜を形成する場合は，中層の澄んだ液）をピペットで新たな容器に移し，蛋白質濃度を測定した後，抽出液として使用する。抽出液中のVg濃度は，肝臓重量あるいは魚体重あたりの濃度として計算しても良いが，抽出率が必ずしも一定とは限らないため，抽出液の総蛋白質に占めるVgの濃度として算出する方が望ましい。

引用文献

Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Shimizu, M., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Kagawa, H., Nagae, M., Sullivan, C.G. and Hara, A. (2007). Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): Purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Exp. Zool.*, **307A**, 324-341.

藤井一則・角埜　彰・原　彰彦（2002）．時間分解蛍光免疫測定法によるマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* コリオジェニンの定量法開発．環境毒性学会誌，**5**，33-41.

藤井一則・角埜　彰・持田和彦（2006）．コリオジェニンによる影響評価．「環境ホルモン－水産生物に対する影響実態と作用機構」，恒星社厚生閣，東京，pp.88-102.

フナコシ. http://search.funakoshi.co.jp/data/datasheet/CYT/G-1.pdf

河野武幸・石川栄治（1992）．抗原抗体反応を利用した超高感度測定法．蛋白質 核酸 酵素，**37**，144-150.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Foin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-272.

Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y. and Matsubara, T. (2003). Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 353-364.

Okumura, H., Hara, A., Saeki, F., Todo, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1995). Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorvent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **61**, 283-289.

上田　宏（2007）．オープンサンドイッチ免疫測定法による低分子の高感度非競合的測定．薬学雑誌，**127**，71-80.

Yamanaka, S., Arizono, K., Matsuda, Y., Soyano, K., Urushitani, H., Iguchi, T. and Sakakibara, R. (1998). Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1196-1200.